



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0114418
(43) 공개일자 2013년10월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

B01D 15/08 (2006.01) *B01D 15/10* (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0036756

(22) 출원일자 2012년04월09일

심사청구일자 2012년04월09일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)

(72) 발명자

구윤모

서울특별시 서초구 서초4동 삼풍아파트 16동 1203호

김진일

인천광역시 서구 가좌2동 진주아파트 402동 106호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

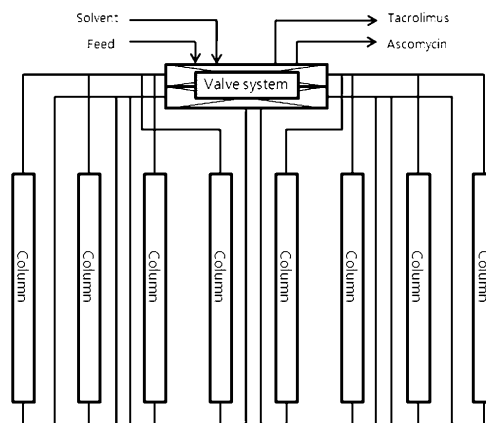
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 모사이드층 크로마토그래피를 이용하여 타크로리무스와 아스코마이신의 혼합액으로부터 타크로리무스를 분리하는 방법

(57) 요약

본 발명은 모사이드층 크로마토그래피를 이용하여 타크로리무스와 아스코마이신의 혼합액으로부터 타크로리무스를 분리하는 방법에 관한 것으로, 상세하게는 흡착칼럼 내의 흡착수지(resin)에 대한 타크로리무스와 아스코마이신의 흡착률 각각을 계산하는 단계(단계 1); 상기 단계 1에서 계산된 흡착률을 삼각형 이론에 적용하여 모사이드층(Simulated Moving bed, SMB) 크로마토그래피 공정의 공정조건을 계산하는 단계(단계 2); 및 모사이드층 크로마토그래피에 타크로리무스와 아스코마이신이 혼합된 원료용액과, 용리액을 공급하고 상기 단계 2에서 계산된 공정조건을 적용하여 타크로리무스를 분리하는 단계(단계 3);를 포함하는 모사이드층 크로마토그래피를 이용하여 타크로리무스와 아스코마이신의 혼합액으로부터 타크로리무스를 분리하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 모사이드층 크로마토그래피를 이용하여 타크로리무스와 아스코마이신의 혼합액으로부터 타크로리무스를 분리하는 방법은 실제 상업화하여 사용할 수 있는 분리 방법으로써, 용리액으로 사용되는 용매의 사용량을 대폭 감소시킬 수 있고, 고순도의 타크로리무스를 고수율로 손쉽게 대량생산할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

함윤범

경기도 안산시 단원구 목내동 454 종근당 바이오
중앙연구소

문정록

인천광역시 남구 용현4동 197-2번지 105호

특허청구의 범위

청구항 1

하기 수학적 식 1을 이용하여 흡착칼럼 내의 흡착수지(resin)에 대한 타크로리무스와 아스코마이신의 흡착물 각각을 계산하는 단계(단계 1);

상기 단계 1에서 계산된 흡착물을 삼각형 이론에 적용하여 모사이동층(Simulated Moving bed, SMB) 크로마토그래피 공정의 공정조건을 계산하는 단계(단계 2); 및

모사이동층 크로마토그래피에 타크로리무스와 아스코마이신이 혼합된 원료용액과, 용리액을 공급하고 상기 단계 2에서 계산된 공정조건을 적용하여 타크로리무스를 분리하는 단계(단계 3);를 포함하는 모사이동층 크로마토그래피를 이용하여 타크로리무스와 아스코마이신의 혼합액으로부터 타크로리무스를 분리하는 방법:

<수학적 식 1>

$$q_i = \alpha \cdot \frac{V_{E,i} - \varepsilon V_{col}}{\varepsilon V_{col}} \cdot \frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \cdot c_i$$

(q_i 는 흡착수지부피당 흡착물을 나타내고,

α 는 보정된 체류인자를 나타내며,

$V_{E,i}$ 는 흡착칼럼 내에서 i 물질의 체류부피를 나타내며,

ε 는 공극률을 나타내고,

V_{col} 은 컬럼의 부피를 나타내며,

c_i 는 주입한 물질의 농도를 나타낸다.).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단계 1의 흡착수지는 C18 흡착수지인 것을 특징으로 하는 모사이동층 크로마토그래피를 이용한 타크로리무스의 분리방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단계 3의 용리액은 아세토나이트릴, 아이소프로판올, 메탄올, 테트라하이드로퓨란, 터트부틸메틸에테르 및 물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용액인 것을 특징으로 하는 모사이동층 크로마토그래피를 이용한 타크로리무스의 분리방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 제조방법에 의해 분리된 타크로리무스는 순도가 99% 이상인 것을 특징으로 하는 모사이동층 크로마토그래피를 이용한 타크로리무스의 분리방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 제조방법을 통한 타크로리무스의 분리는 그 수율이 50% 이상인 것을 특징으로 하는 모사이동층 크로마토그래피를 이용한 타크로리무스의 분리방법.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 모사이동층 크로마토그래피를 이용하여 타크로리무스와 아스코마이신의 혼합액으로부터 타크로리무스를 분리하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 면역억제제는 장기이식분야의 새로운 치료법 개발이 수행되지 않는 한 말기 장기부전증의 치료에 사용되는 최상의 치료법으로, 장기이식의 필요성과 수요의 증가로 많은 발전이 예상되는 분야이다. 그러나, 증가하는 수요와 맞물려 장기이식환자가 평생 복용해야 하는 면역억제제의 판매량이 큰 폭으로 증가하고 있지만, 장기복용에 따르는 부작용과 비싼 가격으로 인하여 새로운 면역억제제의 개발에 대한 요구가 커지고 있다.
- [0003] 면역억제제는 바람직하지 않은 면역반응을 억제해야하는 경우에 사용하게 되는데, 이러한 예로서는 장기이식, 신생아 적아구증의 예방 및 자가면역질환을 치료하는 것을 들 수 있다. 최초 면역억제제로 사용되었던 것은 아자티오프린(azathioprine)이었으며, 이후 사이클로스포린 A(cyclosporin A)를 면역억제제로 이용하였다. 그러나, 상기 사이클로스포린 A는 신장독성, 고혈압, 당뇨병 및 이식 후 림프세포 증식성 질환 등 부작용을 유발시킬 수 있는 문제점이 많다. 이러한 이유로 사이클로스포린 A에 이어서 널리 사용되고 있는 면역억제제는 타크로리무스, 시로리무스, 마이코피로레이트 모페틸 등이 있다. 그 중에서도 사이클로스포린 A에 비해 부작용 측면에서 이식거부와 고혈압 발생률이 낮고 적은 양으로도 동일한 면역억제효과를 나타내는 타크로리무스가 최근 그 사용이 점차 증가하고 있는 추세이다.
- [0004] 일반적으로 타크로리무스는 사이클로스포린 A와 유사하지만 100배 더 강력한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 상기 타크로리무스는 거대고리분자 락톤계열의 항생제로써, 1984년 일본에서 토양 미생물인 *Streptomyces tsukubaensis*로부터 처음 분리되어 졌다. 1, 2 칼시뉴린 억제제로 작용하는 타크로리무스는 미국 식품의약국으로부터 허가를 받아 간 이식(1994), 신장 이식(1997), 심장 이식(2006) 이후 거부반응 억제제로 사용이 되었다.
- [0005] 한편, 의약품으로 쓰이기 위해서는 미국 식품의약국에서 정한 유도체 및 불순물의 함량이 기준치를 넘어서는 안 되며 상기 기준치를 통과해야지만 상업적으로 사용될 수 있으며, 타크로리무스 또한 미생물을 배양한 후 분리 및 정제 공정을 통해서 고순도의 타크로리무스로 분리해내야만 의약품으로서의 역할을 할 수 있게 된다. 이러한 유도체들로는 일반적으로 아스코마이신, 디하이드로타크로리무스, 타투머 1,2 등이 있으며, 그중에서도 타크로리무스와 분자 구조와 화학적·물리적 성질이 가장 비슷한 아스코마이신은 특히 분리가 어렵다.
- [0006] 아스코마이신은 타크로리무스 구조에서 21번째 탄소의 알릴기가 에틸기로 되어 있으며, 그 구조가 타크로리무스와 매우 유사함에 따라 역상 실리카겔을 이용하여도 분리가 어렵고 타투머 1,2를 제거하는데 사용하는 재결정 방법으로도 분리해내지 못한다.
- [0007] 이에 미국 등록특허 제6,492,513 B1에서는 은(silver) 염으로 전 처리된 이온-교환 양이온 수지에 의한 타크로리무스의 정제 방법을 개시한 바 있으나, 이와 같이 양이온교환수지를 이용하는 것은 타크로리무스 정제 공정 중 손실이 크게 발생할 수 있는 문제가 있다. 따라서, 고순도의 타크로리무스를 고수율로 정제해내는 방법이 요구되고 있는 실정이다.
- [0008] 이에 본 발명자들은 고순도의 타크로리무스를 분리하는 방법을 연구하던 중, 모사 이동층 크로마토그래피를 이용하여 타크로리무스와 아스코마이신의 혼합액으로부터 고순도의 타크로리무스를 고수율로 분리할 수 있는 방법을 개발하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용**해결하려는 과제**

[0009] 본 발명의 목적은 모사이동층 크로마토그래피를 이용하여 타크로리무스와 아스코마이신의 혼합액으로부터 타크로리무스를 분리하는 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0011] 하기 수학적 식 1을 이용하여 흡착칼럼 내의 흡착수지(resin)에 대한 타크로리무스와 아스코마이신의 흡착물 각각을 계산하는 단계(단계 1);

[0012] 상기 단계 1에서 계산된 흡착물을 삼각형 이론에 적용하여 모사이동층(Simulated Moving Bed, SMB) 크로마토그래피 공정의 공정조건을 계산하는 단계(단계 2); 및

[0013] 모사이동층 크로마토그래피에 타크로리무스와 아스코마이신이 혼합된 원료용액과, 용리액을 공급하고 상기 단계 2에서 계산된 공정조건을 적용하여 타크로리무스를 분리하는 단계(단계 3);를 포함하는 모사이동층 크로마토그래피를 이용하여 타크로리무스와 아스코마이신의 혼합액으로부터 타크로리무스를 분리하는 방법을 제공한다.

[0014] <수학적 식 1>

$$q_i = \alpha \cdot \frac{V_{E,i} - \varepsilon V_{col}}{\varepsilon V_{col}} \cdot \frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \cdot c_i$$

[0015]

[0016] (q_i 는 흡착수지부피당 흡착물을 나타내고,

[0017] α 는 보정된 체류인자를 나타내며,

[0018] $V_{E,i}$ 는 흡착칼럼 내에서 i 물질의 체류부피를 나타내며,

[0019] ε 는 공극률을 나타내고,

[0020] V_{col} 은 컬럼의 부피를 나타내며,

[0021] c_i 는 주입한 물질의 농도를 나타낸다.)

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따른 모사이동층 크로마토그래피를 이용하여 타크로리무스와 아스코마이신의 혼합액으로부터 타크로리무스를 분리하는 방법은 실제 상업화하여 사용할 수 있는 분리 방법으로써, 용리액으로 사용되는 용매의 사용량을 대폭 감소시킬 수 있고, 고순도의 타크로리무스를 고수율로 손쉽게 대량생산할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 타크로리무스와 아스코마이신의 분자적 구조를 나타낸 그림이고;

도 2는 모사이동층 크로마토그래피의 기본적인 모식도를 나타낸 것이고;

도 3은 고성능액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)를 이용하여 타크로리무스와 아스코마이신을 분석한 그래프이고;

도 4는 타크로리무스와 아스코마이신의 농도에 따른 흡착수지로의 흡착물을 분석한 그래프이고;

도 5는 삼각형 이론을 이용하여 모사이동층 크로마토그래피의 공정조건을 최적화하는 그래프이고;

도 6의 (ㄱ)은 모사이동층 크로마토그래피와 동일한 컬럼 및 장치비용을 갖는 회분식 크로마토그래피를 나타낸 그림이고, (ㄴ)은 모사이동층 크로마토그래피와 동일한 흡착제량을 이용한 회분식 크로마토그래피를 나타낸 것이며;

도 7은 모사이동층 크로마토그래피를 통해 분리된 타크로리무스의 농도와 아스코마이신의 농도를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명은

[0025] 하기 수학적 식 1을 이용하여 흡착칼럼 내의 흡착수지(resin)에 대한 타크로리무스와 아스코마이신의 흡착물 각각을 계산하는 단계(단계 1);

[0026] 상기 단계 1에서 계산된 흡착물을 삼각형 이론에 적용하여 모사이동층(Simulated Moving bed, SMB) 크로마토그래피 공정의 공정조건을 계산하는 단계(단계 2); 및

[0027] 모사이동층 크로마토그래피에 타크로리무스와 아스코마이신이 혼합된 원료용액과, 용리액을 공급하고 상기 단계 2에서 계산된 공정조건을 적용하여 타크로리무스를 분리하는 단계(단계 3);를 포함하는 모사이동층 크로마토그래피를 이용하여 타크로리무스와 아스코마이신의 혼합액으로부터 타크로리무스를 분리하는 방법을 제공한다.

[0028] <수학적 식 1>

$$q_i = \alpha \cdot \frac{V_{E,i} - \varepsilon V_{col}}{\varepsilon V_{col}} \cdot \frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \cdot c_i$$

[0030] (q_i 는 흡착수지부피당 흡착물을 나타내고,

[0031] α 는 보정된 체류인자를 나타내며,

[0032] $V_{E,i}$ 는 흡착칼럼 내에서 i 물질의 체류부피를 나타내며,

[0033] ε 는 공극률을 나타내고,

[0034] V_{col} 은 컬럼의 부피를 나타내며,

[0035] c_i 는 주입한 물질의 농도를 나타낸다.)

[0036] 이하, 본 발명에 따른 분리방법을 각 단계별로 상세히 설명한다.

[0037] 본 발명에 따른 타크로리무스를 분리하는 방법에 있어서, 단계 1은 수학적 식 1을 이용하여 흡착칼럼 내의 흡착수지(resin)에 대한 타크로리무스와 아스코마이신의 흡착물 각각을 계산하는 단계이다.

[0038] 도 1은 아스코마이신과 타크로리무스의 구조를 나타낸 그림으로, 도 1에 나타낸 바와 같이 아스코마이신은 타크로리무스 구조에서 21번째 탄소의 알릴기가 에틸기로 되어 있으며, 그 구조가 타크로리무스와 매우 유사함에 따라 역상 실리카겔을 이용하여도 분리가 어렵고 타투머 1,2를 제거하는데 사용하는 재결정 방법으로도 분리할 수 없다. 본 발명에서는 이와 같이 분리가 어려운 아스코마이신과 타크로리무스를 분리하여 고순도의 타크로리무스를 정제하기 위하여 모사이동층 크로마토그래피를 이용한다. 이때, 상기 단계 1에서 타크로리무스와 아스코마이신의 흡착물을 분석하는 것은 모사이동층 크로마토그래피 공정의 공정조건을 설계하기 위한 주요인자 중 하나로써, 타크로리무스와 아스코마이신의 흡착물로부터 이들의 흡착상수값을 계산해낼 수 있으며, 이를 토대로 모사

이동층 크로마토그래피에 공급할 타크로리무스와 아스코마이신의 유량 등을 도출해낼 수 있다.

[0039] 한편, 상기 단계 1에서는 타크로리무스와 아스코마이신의 흡착수지에 대한 흡착률을 수학적 식 1을 이용하여 계산해낸다. 상기 단계 1의 흡착률 분석은 아세트나이트릴, 아이소프로판올, 메탄올, 테트라하이드로퓨란, 터트부틸메틸에테르, 물 등의 용매를 이용하여 고성능액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)를 통해 수행하며, 바람직하게는 인산, 아세트나이트릴, 터트부틸메틸에테르, 물을 혼합한 용매와 C18 흡착컬럼으로 구성된 HPLC를 통해 수행할 수 있다.

[0040] 상기 단계 1에서 수학적 식 1을 이용하여 흡착률을 계산하는 것은 일반적인 전단분석법과 비교하여 주입되는 시료량이 적기 때문에 소량의 물질을 분석하는 것에 유리하며, 빠른 분석으로 인하여 처리시간을 단축시킬 수 있다. 또한, 타크로리무스와 아스코마이신의 농도를 변화시키며 도출해내는 보정된 체류인자를 상기 수학적 식 1에 적용함으로써 보다 정확한 흡착률을 계산해낼 수 있다.

[0041] 본 발명에 따른 타크로리무스를 분리하는 방법에 있어서, 단계 2는 상기 단계 1에서 계산된 흡착률을 삼각형 이론에 적용하여 모사이동층(Simulated Moving bed, SMB) 크로마토그래피 공정의 공정조건을 계산하는 단계이다.

[0042] 모사이동층(Simulated Moving Bed, SMB) 크로마토그래피 공정은 효율적인 분리를 위해 연속적인 향류(counter-current flow)를 이용하는 TMB(True Moving Bed)공정을 모사한 공정으로, 본 발명에서의 모사이동층 크로마토그래피 공정 장비를 도 2의 그림을 통해 나타내었다.

[0043] 도 2에 도시된 바와 같이, SMB 크로마토그래피 공정은 복수개의 흡착컬럼을 포함하며, 상기 흡착컬럼 내로 공급되는 물질들의 유량을 조절하기 위한 조절 밸브 시스템을 포함할 수 있다. 또한, 용리액과 혼합원료물질이 유입되는 2개의 유입구와 분리된 물질(아스코마이신, 타크로리무스)이 각각 유출되는 2개의 유출구로 구성될 수 있으며, 상기 두 개의 유출구 및 유입구는 공정설계를 통해 결정된 교환시간마다 밸브에 의하여 이동상인 용리액의 이동 방향을 따라 이동하여 이동상과 고정상의 향류를 모사한다.

[0044] 이때, SMB 크로마토그래피 공정을 구성하는 유입구, 유출구 및 흡착컬럼으로 공급되는 혼합물질의 유량과 교환시간은 일반적으로 삼각형 이론(triangle theory)을 이용하여 결정하며, 상기 삼각형 이론을 이루는 식은 하기 수학적 식 2와 같이 정의할 수 있다.

[0045] <수학적 식 2>

$$\alpha \cdot \frac{V_{E, \text{아스코마이신}} - \varepsilon V_{col}}{\varepsilon V_{col}} \cdot \frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} < \text{유량비율}_2 < \text{유량비율}_3 < \alpha \cdot \frac{V_{E, \text{타크로리무스}} - \varepsilon V_{col}}{\varepsilon V_{col}} \cdot \frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon}$$

[0047] (α 는 보정된 체류인자를 나타내며,

[0048] $V_{E,i}$ 는 흡착컬럼 내에서 각 물질의 체류부피를 나타내며,

[0049] ε 는 공극률을 나타내고,

[0050] V_{col} 은 컬럼의 부피를 나타낸다.)

[0051] 상기 삼각형 이론은 분리하고자 하는 두 물질의 등온흡착식과 컬럼 특성을 이용하여 모사이동층 공정의 운전을 위한 조업조건을 계산하며, 상기 단계 2에서는 단계 1에서 계산된 흡착률을 삼각형 이론에 적용하여 모사이동층(Simulated Moving bed, SMB) 크로마토그래피 공정의 공정조건, 즉 아스코마이신과 타크로리무스 혼합물질의 유량, 교환시간 등을 결정한다. 이때, 상기 흡착률을 삼각형 이론에 적용한다는 것은 흡착률로부터 도출된 흡착상수값을 삼각형 이론의 계산식에 적용함을 의미하며, 공정조건을 계산은 크로마토그래피 모사프로그램을 이용하여 수행할 수 있으며, 상기 모사프로그램은 일반적으로 SMB 공정에 사용되는 모사프로그램을 선택하여 이용할 수 있다.

- [0052] 본 발명에 따른 타크로리무스를 분리하는 방법에 있어서, 단계 3은 모사이동층 크로마토그래피에 타크로리무스와 아스코마이신이 혼합된 원료용액과, 용리액을 공급하고 상기 단계 2에서 계산된 공정조건을 적용하여 타크로리무스를 분리하는 단계이다.
- [0053] 상기 단계 2에서 삼각형 이론을 통해 계산된 공정조건으로 모사이동층 크로마토그래피 장치를 설계하고, 설계된 장치로 타크로리무스와 아스코마이신이 혼합된 원료용액과, 용리액을 공급하여 공정을 수행함으로써, 고순도의 타크로리무스를 분리할 수 있다. 이때, 상기 용리액으로는 아세트나이트릴, 아이소프로판올, 메탄올, 테트라하이드로퓨란, 터트부틸메틸에테르, 물 등의 용매를 사용할 수 있으며, 경우에 따라 이들을 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0054] 상기 단계 3에서 모사이동층 크로마토그래피를 이용함으로써, 타크로리무스와 아스코마이신의 혼합물로부터 고순도의 타크로리무스를 고순도로 분리해낼 수 있다. 즉, 모사이동층 크로마토그래피를 이용함에 따라 일반적인 회분식 크로마토그래피와 비교하여 매우 적은 양의 용리액(용매)가 사용되어 고농도 및 고순도의 타크로리무스가 분리되고, 연속공정이 가능함에 따라 그 생산량 또한 향상시킬 수 있다.
- [0055] 본 발명에 따른 상기 분리방법을 통해 타크로리무스를 99% 이상의 고순도로 분리할 수 있으며, 분리된 타크로리무스는 바람직하지 않은 유도체인 아스코마이신이 대부분 제거된 상태이기 때문에 면역억제제로 사용하기 적합하다. 또한, 일반적인 크로마토그래피와는 달리 생산수율이 우수하여 50% 이상의 수율을 나타낼 수 있어 고순도의 타크로리무스를 대량생산이 가능하며, 이를 통해 상기 분리방법이 상업적으로 이용하기 적합함을 알 수 있다.
- [0056] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 더욱 상세히 설명한다. 단, 하기의 실시예는 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0057] <실시예 1> 타크로리무스와 아스코마이신의 혼합액으로부터 고순도 타크로리무스의 분리
- [0058] 단계 1 : 스트랩토마이세스속인 균주를 발효시켜 타크로리무스와 아스코마이신을 포함하는 발효배양액을 제조하였으며, 상기 발효 배양액으로부터 타크로리무스를 추출하였다.
- [0059] 아스코마이신을 포함하는 상기 추출된 타크로리무스를 고성능액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)를 이용하여 혼합물을 분석하였다. 이를 증명하기 위한 HPLC분석은 인산, 아세트나이트릴, 터트부틸메틸에테르, 물의 혼합 용매를 이용하였다. 상기 HPLC 분석의 결과는 도 3에 나타내었다. 또한, 도 4에 나타낸 바와 같이 타크로리무스와 아스코마이신의 농도별로 보정된 체류인자를 구하였으며, 보정된 체류인자를 수학적 식 1에 적용하여 타크로리무스와 아스코마이신의 혼합물을 계산하였다. 이때, 계산된 타크로리무스와 아스코마이신의 혼합물은 각각 4.188과 3.671로 나타났다.
- [0060] 단계 2 : 상기 단계 1의 분석결과 도출된 혼합물을 이용하여 타크로리무스와 아스코마이신의 혼합상수를 도출해 내었으며, 이를 토대로 도 5에 나타낸 바와 같이 삼각형 이론에 따른 삼각형을 도시함으로써, 모사이동층 크로마토그래피의 교환시간, 원료물질 및 용리액의 유량 등의 공정조건을 도출해내었다.
- [0061] 이때, 도 5에 도시한 삼각형에 포함되는 모든 운전 조건은 이론적으로 고순도의 물질을 추출할 수 있다. 그러나, 실질적으로 많은 주변 환경들과 다이내믹으로 인하여 상기 삼각형 내에서 최적의 점을 찾아야 하며, 본 발명자는 도 5에 도시한 삼각형 중 최적의 운전 조건을 선택하여 모사이동층 크로마토그래피의 공정조건을 도출해내었다.
- [0062] 단계 3 : 상기 단계 2에서 도출된 공정조건을 토대로 도 1에 개략적으로 나타낸 바와 같은 모사이동층 크로마토그래피를 설계하였으며, 설계된 모사이동층 크로마토그래피로 타크로리무스와 아스코마이신이 혼합된 혼합원료와, 용리액으로써 물, 테트라하이드로퓨란 및 아이소프로판올을 혼합한 혼합용매를 공급하여 공정을 진행하였으며, 그 결과 고순도의 타크로리무스를 분리해내었다.

[0063] 이때, 실시예 1에서 모사이동층 크로마토그래피 공정을 진행한 공정조건은 하기 표 1 및 표 2에 정리하여 나타내었다.

표 1

[0064]

원료물질의 농도 (g/l)	타크로리무스	0.93
	아스코마이신	0.07
유 량 (ml/min)	용 리 액	2.30
	추 출 물	0.88
	추출 잔류물	2.22
	재 순 환	7.00
교 환 시 간 (min)		0.5

표 2

[0065]

V (ml)	1.7	컬럼의 부피
ϵ	0.4725	전체 공극률
Q ₁ (ml/min)	9.30	컬럼1의 유량
Q ₂ (ml/min)	8.42	컬럼2의 유량
Q ₃ (ml/min)	9.22	컬럼3의 유량
Q ₄ (ml/min)	7.00	컬럼4의 유량
H ₁	3.671	추출잔류물인 아스코마이신의 헨리상수
H ₂	4.188	추출물인 타크로리무스의 헨리상수
C _{1 raffinate} (g/l)	0.025	추출잔류물인 아스코마이신의 농도
C _{2 extract} (g/l)	0.447	추출물인 타크로리무스의 농도

[0066] <비교예 1 및 2>

[0067] 도 6에 개략적으로 나타난 회분식 크로마토그래피를 이용하여 아스코마이신과 타크로리무스 혼합액의 분리를 수행하였다.

[0068] 이때, 상기 도 3의 (ㄱ)은 실시예 1에서 사용한 모사이동층 크로마토그래피와 동일한 컬럼 및 장치비용을 갖도록 구성된 회분식 크로마토그래피(비교예 1)이며,

[0069] 도 3의 (ㄴ)은 실시예 1에서 사용한 모사이동층 크로마토그래피와 동일한 흡착제량을 적용한 회분식 크로마토그래피(비교예 2)이다.

[0070] 비교예 1 및 2의 회분식 크로마토그래피의 공정조건은 하기 표 3에 정리한 바와 같으며, 상기 공정조건은 하나의 흡착컬럼을 이용한 시뮬레이션 후, 도출된 값을 스케일업하여 설정하였다.

표 3

[0071]

원료물질의 농도 (g/l)	타크로리무스	0.93
	아스코마이신	0.07
유 량 (ml/min)	용 리 액	1.80
교 환 시 간 (min)		4
컬럼의 부피 (ml)		1.7
전체 공극률		0.4725

[0072] 분석

- [0073] (1) 고성능액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 분석
- [0074] 아스코마이신과 타크로리무스의 흡착물 분석을 위해 고성능액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 아스코마이신과 타크로리무스의 혼합물을 분석하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0075] 도 3에 나타난 바와 같이, HPLC의 분석결과 가장 큰 면적을 가지는 피크는 타크로리무스를 나타냄을 알 수 있으며, 상기 피크의 앞에서 검출된 피크는 아스코마이신을 나타낸다. 즉, 본 발명에서 인산, 아세트나이트릴, 터트부틸메틸에테르, 물을 혼합하여 HPLC 분석에 사용함으로써, 아스코마이신과 타크로리무스를 완전히 분리하여 확인할 수 있음을 알 수 있다. 이에 따라, 상기 혼합용매를 이용하여 HPLC 분석을 수행하는 것은 아스코마이신과 타크로리무스의 분석에 적합함을 확인하였다.
- [0076] (2) C18 흡착수지 부피에 대한 흡착물 분석
- [0077] 실제 모사이동층 크로마토그래피에 흡착수지로 사용된 C18 흡착수지의 부피에 대한 아스코마이신과 타크로리무스의 흡착물을 분석하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0078] 도 4에 나타난 바와 같이, 아스코마이신의 C18 흡착수지에 대한 흡착물은 타크로리무스 보다 낮은 것을 알 수 있다. 즉, 구조가 유사함에 따라 분리가 어려웠던 상기 두 물질은 C18 흡착수지에 대한 흡착물의 차이가 있음을 알 수 있으며, 이들의 흡착물 차이를 이용하여 타크로리무스를 분리할 수 있음을 예측할 수 있다.
- [0079] (3) 모사이동층 크로마토그래피를 이용하여 분리된 타크로리무스의 분석
- [0080] 상기 실시예 1, 비교예 1 및 2에서 분리된 타크로리무스의 특성을 고성능액체크로마토그래피를 이용하여 분석하였고, 그 결과를 표 4 및 도 7에 나타내었다.

표 4

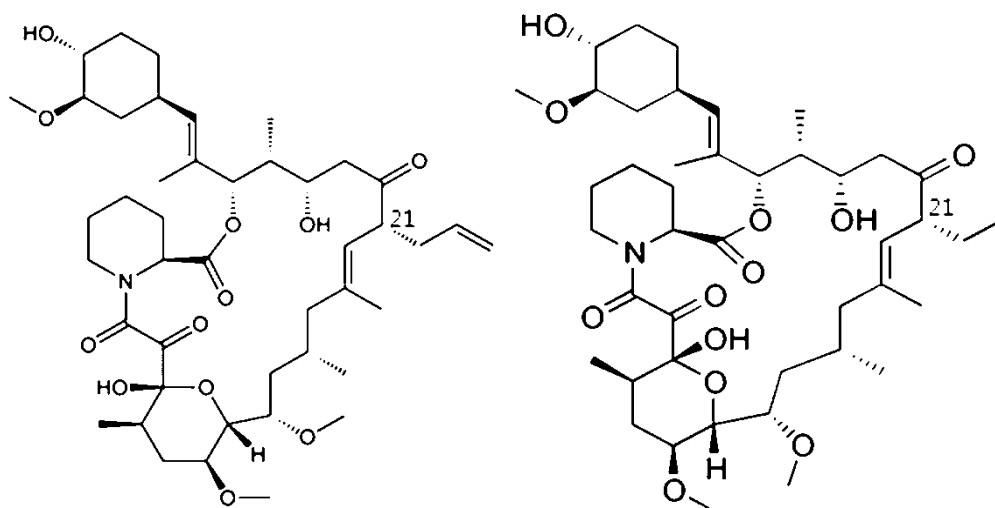
[0081]	실시예 1	비교예 1	비교예 2
원료 처리량 (g/년)	391.05		
순도 (%)	99.94	99.69	99.63
수율 (%)	52.84	3.10	6.43
농축도 (%)	48.04	19.23	2.13
원료대비 용매 사용량	2.88	18.00	19.53
생산성 (g/년)	206.63	12.12	2.61

- [0082] 표 4 및 도 7에 나타난 바와 같이, 실시예 1, 비교예 및 비교예 2에서 분리된 타크로리무스의 순도는 99% 이상으로 분리됨을 알 수 있다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예 1에서 모사이동층 크로마토그래피를 이용하는 경우 회분식 크로마토그래피와 비교하여 원료대비 용매 사용량을 매우 절감할 수 있다. 또한 비교예 1 및 2에서 회분식 크로마토그래피를 이용한 것보다 많게는 약 17배, 적게는 약 8배 가까이 수율이 향상된 것을 알 수 있었으며, 농축도 또한 최소 약 2배에서 최대 약 24배까지 높아진 것을 알 수 있었다. 나아가, 연간 생산량으로 비교하였을 때, 모사이동층 크로마토그래피를 이용하는 것이 회분식 크로마토그래피보다 최소 약 17배, 많게는 약 80배까지 증대되는 것을 알 수 있다. 이를 통해, 본 발명에 따른 분리방법에서 모사이동층 크로마토그래피를 이용하여 고순도의 타크로리무스를 분리할 수 있으며, 특히 그 수율이 우수함에 따라 대량의 타크로리무스를 제조할 수 있어 상업적 이용성이 매우 우수함을 확인하였다.

- [0083]
- [0084] 이상에 설명한 바와 같이, 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 본 발명의 범위는 상기의 상세한 설명보다는 후술할 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

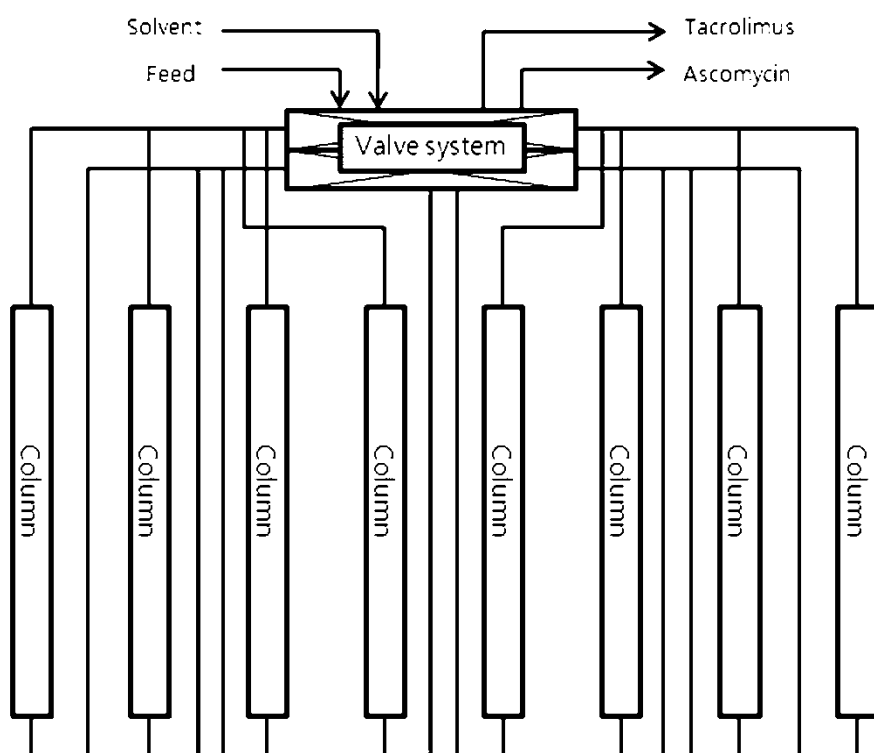
도면1



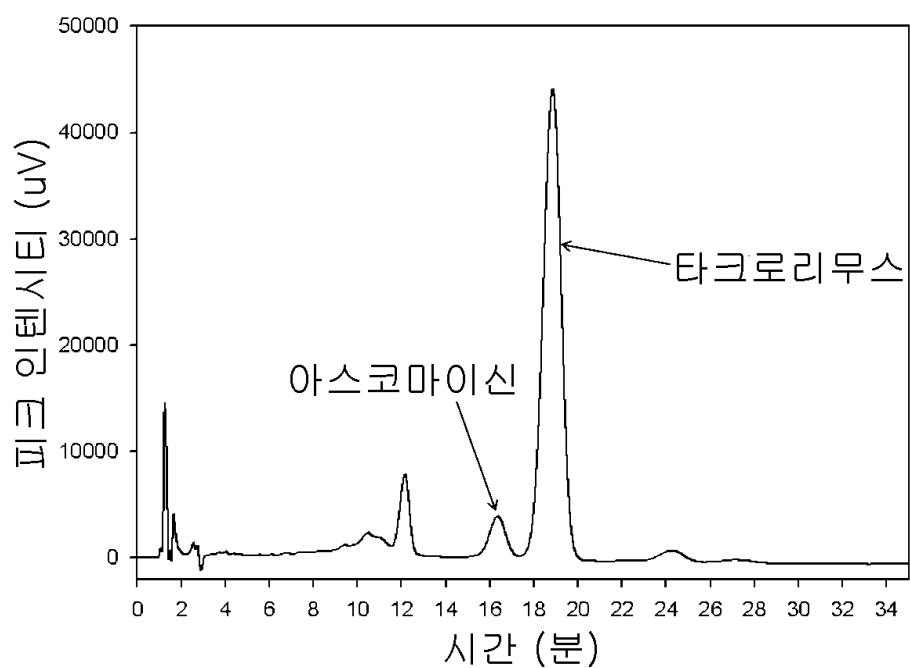
타크로리무스

아스코마이신

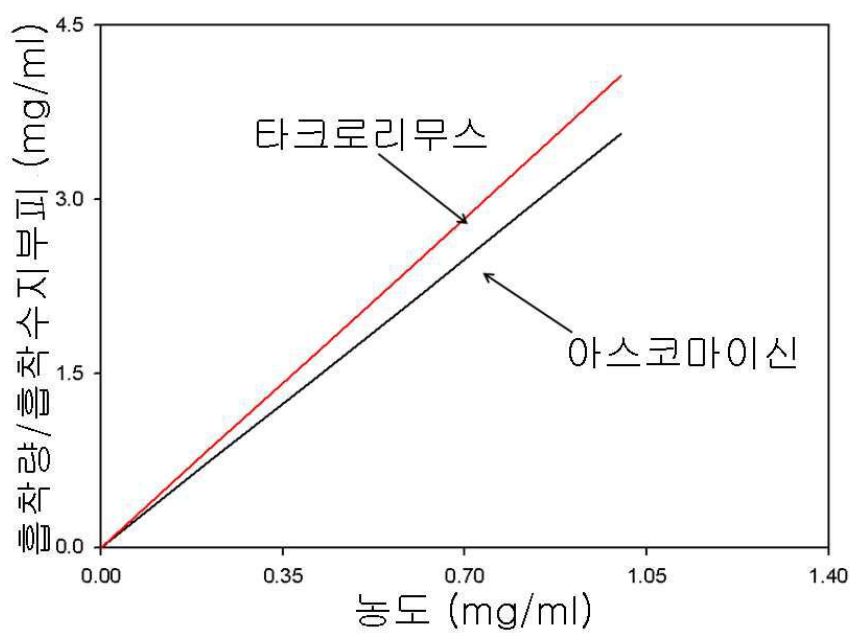
도면2



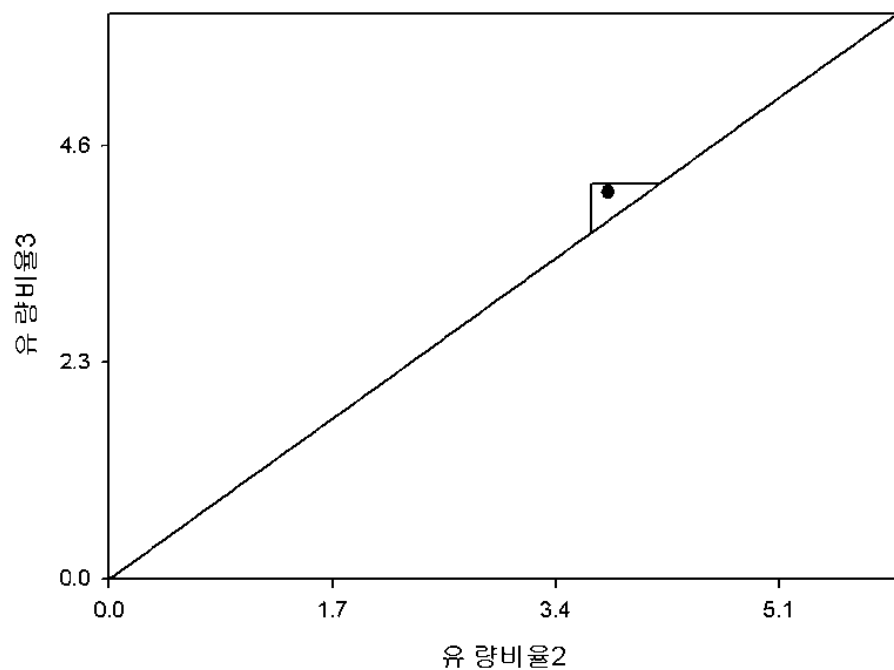
도면3



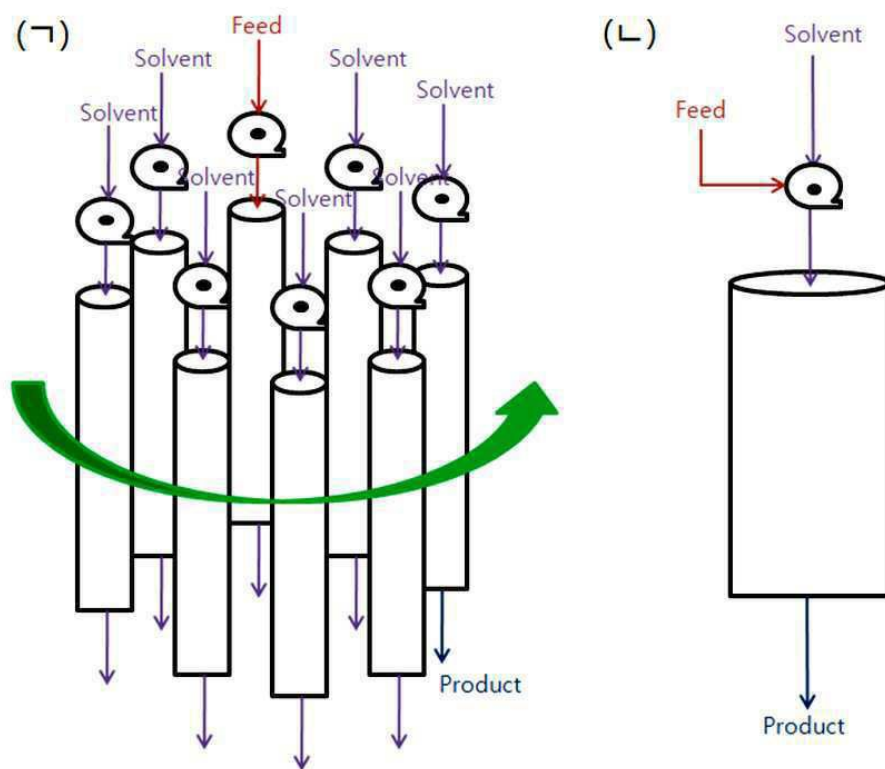
도면4



도면5



도면6



도면7

